

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7173497号
(P7173497)

(45)発行日 令和4年11月16日(2022.11.16)

(24)登録日 令和4年11月8日(2022.11.8)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 N 5/071(2010.01) C 1 2 N 5/071

請求項の数 2 (全15頁)

(21)出願番号	特願2019-565553(P2019-565553)	(73)特許権者	519418983
(86)(22)出願日	令和1年7月18日(2019.7.18)		エムケイバイオテック カンパニー リミ
(65)公表番号	特表2021-529505(P2021-529505		テッド
	A)		MKBIOTECH. CO., LTD.
(43)公表日	令和3年11月4日(2021.11.4)		大韓民国 大田廣域市 儒城區 大學路 9
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/008861		9、207
(87)国際公開番号	WO2020/213789		207, 99, Daehak-ro Y
(87)国際公開日	令和2年10月22日(2020.10.22)		useong-Gu Daejeon R
審査請求日	令和1年11月22日(2019.11.22)		epublic of Korea
(31)優先権主張番号	10-2019-0045801	(73)特許権者	513081963
(32)優先日	平成31年4月19日(2019.4.19)		忠南大學校 産學協力團
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		THE INDUSTRY & ACAD
			EMIC COOPERATION IN
			CHUNGNAM NATIONAL U
			NIVERSITY
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法およびそれによる凍結解凍卵子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

イヌ科動物の成熟卵子を採取する過程（1過程）、
 前記採取した卵子に対してガラス化凍結過程（2過程）を行い、
 前記2過程は、
 混合液、平衡溶液、ガラス化溶液を準備する過程（2過程－1）、
 前記回収した卵子の卵丘細胞を除去する過程（denuding）（2過程－2）、
 前記卵丘細胞を除去した成熟卵子を室温に平衡させた混合液に処理する過程（2過程－3）、
 前記卵子が含まれている混合液に平衡溶液を追加して処理した後、再び平衡溶液をさらに追加して処理する過程（2過程－4）、
 前記処理を経た卵子を再び平衡溶液で処理する過程（2過程－5）、
 処理した卵子をガラス化溶液に移して処理する過程（2過程－6）、および
 卵子を卵子凍結道具に載せてガラス化溶液の除去後に直ちに液体窒素に浸漬して保管する過程（2過程－7）
 を含み、

前記混合液は、SSS（Serum Substitute Supplement）およびmHTF（Modified HTF Medium－HEPES with Gentamicin）を混合したものであり、

前記平衡溶液は、エチレングリコール（Ethylene glycol）、ジメチル

10

20

スルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、

前記ガラス化溶液は、エチレングリコール (Ethylene glycol)、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、スクロース (Sucrose) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成されることを特徴とする、イヌ科動物の卵子をガラス化凍結する方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法によりガラス化凍結された卵子に対して解凍する過程 (3 過程) を行い、

前記 3 過程は、

解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液を準備する過程 (3 過程-1)、

解凍溶液 (Thawing Solution) をインキュベータで 35 ~ 40 °C に加温させる過程 (3 過程-2)、

回復培養液 (Recovery Medium) をインキュベータで 35 ~ 40 °C に加温させる過程 (3 過程-3)、

液体窒素に保管された卵子凍結道具 (CryoTop) を取り出して加温した解凍溶液に入れ、卵子凍結道具に付着している卵子を分離して処理する過程 (3 過程-4)、

前記分離した卵子を常温に平衡させた希釈溶液に移して処理する過程 (3 過程-5)、

前記処理された卵子を常温に平衡させた 2 個の洗浄溶液に移して順次処理する過程 (3 過程-6)、および

前記過程後、回復培養のために前記加温した回復培養液で培養する過程 (3 過程-7) を含み、

前記解凍溶液は、スクロース (Sucrose)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、

前記希釈溶液は、スクロース (Sucrose)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、

前記洗浄溶液は、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、

前記回復培養液は、HEPES 緩衝溶液、ピルビン酸ナトリウム (Sodium pyruvate)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate)、FBS (Fetal Bovine Serum) を混合したものから構成されることを特徴とする、ガラス化凍結されたイヌ科動物の卵子を解凍する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体細胞クローンのための動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法に関し、より具体的には、イヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法およびそれによる凍結解凍卵子に関する。

【背景技術】

【0002】

体細胞クローンとは、卵子の核を除去した後、複製しようとする体細胞の核を移植して体細胞と同一の遺伝情報を有したクローン生物を作り出すことをいう。体細胞クローンは、卵子と精子が結合する受精過程無しにも体細胞核移植を通じて生命体を誕生できる画期的な技術である。現在、体細胞クローン技術は、有用動物の生産、高価な薬剤生産用の形質転換動物の生産、絶滅に瀕した動物種のクローン、ペットのクローンおよび再生医学な

10

20

30

40

50

どに現実的に多様に利用されている。

【0003】

体細胞クローンは、ドナー卵から核を除去する除核（enucleation）過程、体細胞を除核したドナー卵に移植する核移植（nuclear transfer）過程、体細胞とドナー卵の細胞融合（cell fusion）過程、細胞融合したドナー卵の細胞質活性を誘導する卵活性（ovum activation）過程、および全ての過程が処理された体細胞クローン受精卵の培養（culture）過程など、体外で長時間極微操作装置を用いた精巧な機械的技術と化学的処理が要求される。これには、基本材料として、ドナー卵子と複製しようとする遺伝情報を有した体細胞とが必要である。体細胞クローン動物の生産は、1997年に英国のWilmutらが羊をもって最初に報告して以来、マウス（Wakayamaら、1998）、ヤギ（Baguisiら、1999）、豚（Polejaevaら、2000）、ウサギ（Chesneら、2002）、猫（Shinら、2002）などのような様々な種での研究結果が報告されており、クローン牛の生産の場合は、1998年にKatoらとCibelliらによって研究結果が報告されており、韓国でもImら（2001）とKimら（2010）によって韓牛に対するクローン牛の生産について報告されている。しかし、体細胞クローン動物の生産効率は、5%未満として非常に小さいことが知られている（Heymanら、2002；Yangら、2008）。

10

【0004】

体細胞クローンのために体細胞を予め凍結保存だけをしておけば、必要時に融解していつでも使用することができ、増殖過程を通じて多数の細胞を得ることができるため、一部損失してもクローンに活用するのに問題がない。体細胞凍結方法は、既に普遍化しており、生存率が高いため、体細胞クローンに使われる細胞数の確保に困難がないためである。

20

【0005】

その反面、ドナー卵の卵子は、殺時に得る卵巣からのみ回収することができるため、口蹄疫のような突然の自然災害が発生する場合または殺が難しく卵巣の供給を受けることができない場合には、新鮮な卵子を得ることができないため、体細胞クローンに利用できなくなる。したがって、卵子の持続的な供給のために、未受精卵子を凍結保存しておく必要がある。また、環境汚染または自然破壊による、絶滅に瀕した動物または繁殖力が低下している動物を保護し蘇らせようとする努力が全世界的になされているところ、良質の卵子を予め選別し保管しておくのであれば、体細胞クローン研究のみならず、卵子が必要な他の研究にいつでも有用に利用できるという長所がある。

30

【0006】

このような凍結保存の核心技術は、細胞内で約90%を占める水の処理である。水は凍結過程で鋭い氷の結晶を形成し、そのため、細胞膜に傷ができて解凍後に細胞が死ぬことになる。一般体細胞や精子と比較して、哺乳類の卵子は、その大きさが約120～150 μm程度として約5万倍以上であり、他の細胞に比べて細胞内に多くの水を有しているだけでなく、特に成熟卵子の場合、染色体とそれを分離する染色体分裂機構が細胞質内に直接露出しており凍結保存が難しい。したがって、凍結過程を経ても卵子を安全に保護できる技術が求められ、さらに凍結および融解後にも卵子の生存率を高める技術も求められる。

40

【0007】

特にイヌ科動物のイヌは、哺乳類とは異なり、未成熟卵子を排卵して卵管で2～3日後に成熟した後に受精になる特異的な繁殖生理システムを有しており、体内卵子の採取時期が実験の成果を左右する。そのため、同じ時期に発情が来る実験犬を確保できない場合にはガラス化凍結を通じて十分な数量の卵子を確保する技術が必要であるが、現在のところ、このような実験結果および技術に非常に不備がある状況である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

イヌ科動物のイヌは、哺乳類とは異なり、未成熟卵子を排卵して卵管で2～3日後に成

50

熟した後に受精になる特異的な繁殖生理システムを有しており、体内卵子の採取時期が実験の成果を左右する。そのため、同じ時期に発情が来る実験犬を確保できない場合にはガラス化凍結を通じて十分な数量の卵子を確保する技術が必要であるが、現在のところ、このような実験結果および技術に非常に不備がある状況である。

【0009】

さらに、現在までイヌの未成熟卵子の凍結が試みられたが、未だに体外成熟システムに不備があつて成熟卵子のガラス化凍結技術としての活用価値が顕著に落ちた状況であるため、イヌの体細胞クローンの活用性が不十分な実情である。

【0010】

したがって、本発明は、イヌの成熟卵子を採取してガラス化凍結ができるイヌ科動物のガラス化凍結卵子の生産方法を提供し、また、このような生産方法による凍結卵子を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、前記目的および要求を解決するために、
イヌ科動物の成熟卵子を採取する過程（1過程）、
前記採取した卵子をガラス化凍結過程（2過程）を行い、
混合液、平衡溶液、ガラス化溶液を準備する過程（2過程-1）、
2過程-1において、前記混合液は10～30% SSS (Serum Substitute Supplement) 100重量部にmHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) 300～1000重量部を混合したものであり、

前記平衡溶液は6.5～8.5% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、6.5～8.5% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、10～30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) そして25～45 μg/mlの硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含むHEPES緩衝溶液から構成され、

前記ガラス化溶液 (Vitrification Solution) は5～25% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、5～25% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、10～30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、0.3～0.6Mスクロース (Sucrose)、25～45 μg/mlの硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含むHEPES緩衝溶液から構成され、

前記回収した卵子の卵丘細胞の除去過程を経る (denuding) 過程（2過程-2）、

前記卵丘細胞を除去した成熟卵子を室温に平衡させた混合液に処理する過程（2過程-3）、

前記卵子が含まれている混合液に平衡溶液を追加して処理した後、再び平衡溶液をさらに追加して処理する過程（2過程-4）、

前記処理を経た卵子を再び平衡溶液で処理する過程（2過程-5）、

処理した卵子をガラス化溶液に移して処理する過程（2過程-6）、および
卵子を卵子凍結道具に載せてガラス化溶液の除去後に直ちに液体窒素に浸漬して保管する過程（2過程-7）、

を含むイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法を提供する。

【0012】

また、本発明は、ガラス化凍結卵子に対して融解する過程（3過程）を行い、
解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液を準備する過程を行うが（3過程-1）、

3過程-1において、解凍溶液 (Thawing Solution) は0.5～1.5Mスクロース (Sucrose)、10～30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) そして25～45 μg/mlの硫酸ゲンタマイ

10

20

30

40

50

シン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、希釈溶液 (Dilution Solution) は 0.3 ~ 0.7 M スクロース (Sucrose)、10 ~ 30 % デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) そして 25 ~ 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) を含む HEPES 緩衝溶液から構成され、

回復培養液 (Recovery Medium) は HEPES 緩衝溶液、ピルビン酸ナトリウム (Sodium pyruvate)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate)、FBS (Fetal Bovine Serum) を混合したものから構成され、

解凍溶液 (Thawing Solution) をインキュベータで 35 ~ 40 °C に加温させる過程 (3 過程 - 2)、

回復培養液 (Recovery Medium) をインキュベータで 35 ~ 40 °C に加温させる過程 (3 過程 - 3)、

液体窒素に保管された卵子凍結道具 (CryoTop) を取り出して加温した解凍溶液に入れ、卵子凍結道具 (CryoTop) に付着している卵子を分離して処理する過程 (3 過程 - 4)、

前記分離した卵子を常温に平衡させた希釈溶液に移して処理する過程 (3 過程 - 5)、

前記処理された卵子を常温に平衡させた 2 個の洗浄溶液に移して順次処理する過程 (3 過程 - 6)、および

前記過程後、回復培養のために前記加温した回復培養液で培養する過程 (3 過程 - 7)、を含むことを特徴とするイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法を提供する。

【0013】

また、本発明は、上記のようなイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法により形成された凍結解凍卵子を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係るイヌ科動物の卵子をガラス化凍結する方法は、混合液、平衡溶液、ガラス化溶液の技術的特性およびガラス化凍結方法により、凍結過程中に卵子内の氷結晶の形成が防止され、細胞内の水が相当除去され、また、液体窒素に直ちにを入れて凍結させる超急速冷凍法として、氷結晶が防止されて細胞壁と膜が保護され、毒性が顕著に減って生存率が顕著に高くなるという効果がある。

【0015】

また、本発明に係るイヌ科動物の卵子を解凍する方法は、解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液の技術的特徴および解凍方法の特徴により、凍結解凍卵子の生存性が顕著に高くなるという効果があり、それにより、本発明に係る凍結解凍卵子は高い核移植培養効果が現れる。

【0016】

なお、従来技術に係るイヌのガラス化凍結卵子の生産技術は、発情周期が異なって同期化し難い状況であるのに対し、本発明に係るイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法およびそれによる凍結解凍卵子は、異なる日付の発情が来ても、採取した卵子をガラス化凍結技術によって実験日程を同期化することができるため、高い核移植および受精の効果が現れる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の一実施形態による卵子凍結道具である CryoTop (Kitazato, Japan) に関するものである。

【図2】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

【図3】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

10

20

30

40

50

【図4】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

【図5】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

【図6】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

【図7】イヌの成熟卵子をガラス化凍結し解凍する過程における成熟卵子の状態に関する写真である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、イヌ科動物の成熟卵子を採取する過程（1過程）、前記採取した卵子をガラス化凍結過程（2過程）を行い、混合液、平衡溶液、ガラス化溶液を準備する過程（2過程-1）、前記回収した卵子の卵丘細胞を除去する過程（denuiding）（2過程-2）、前記卵丘細胞を除去した成熟卵子を室温に平衡させた混合液に処理する過程（2過程-3）、前記卵子が含まれている混合液に平衡溶液を追加して処理した後、再び平衡溶液をさらに追加して処理する過程（2過程-4）、前記処理を経た卵子を再び平衡溶液で処理する過程（2過程-5）、処理した卵子をガラス化溶液に移して処理する過程（2過程-6）、および卵子を卵子凍結道具に載せてガラス化溶液の除去後に直ちに液体窒素に浸漬して保管する過程（2過程-7）を含む、イヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法に関する。

【0019】

以下では、本発明について図面を参照して詳しく説明する。

【0020】

本発明は、イヌ科動物のガラス化凍結卵子の生産方法、およびこのようなガラス化凍結卵子の生産方法によるイヌ科動物の凍結卵子を提供する。

【0021】

本発明は、まず、イヌ科動物の成熟卵子を採取する過程を行う（1過程）。

【0022】

本発明において、イヌ科動物は、キツネ、タヌキ、オオカミ、野犬、畜犬などを意味し、代表的にはイヌを意味する。

【0023】

本発明は、1～5年齢の雑種の発情犬から手術的な方法で成熟した卵子を回収する方法を行う。

【0024】

特に、本発明は、発情が観察された日から毎日採血してVetchroma（Anivet、Korea）を用いて血清内プロゲステロン（P4）を測定した。プロゲステロン濃度が10ng/ml以上になる日を排卵日に取り、その後72時間後に外科的手術によって体内から成熟したレシピエント卵子を回収（採取）する。

【0025】

レシピエント卵子を採取する過程は、発情犬を5～7mg/ml、好ましくは6mg/mlのケタミン（ketamine）で麻酔した後、1.5～2.5%、好ましくは2%イソフルラン（isoflurane）で麻酔を維持しながら手術を進行する。

【0026】

開腹し子宮を取り出して固定させた後、卵巣を囲むベルサのスリットを通して卵管開始部にフラッシングニードル（flushing needle）を取り付ける。卵管接合部に隣接した卵管に血管内チューブカテーテル（IV catheter）を挿入し、フラッシング培地を用いて成熟卵子を回収する。

【0027】

本発明は、前記採取した卵子に対してガラス化凍結過程を行う（2過程）。

【0028】

本発明の採取した卵子のガラス化凍結過程は、下記の細部過程により行われる。

【0029】

本発明の技術的特徴は、下記のガラス化凍結過程に用いられる混合液、平衡溶液、ガラス化溶液の構成にある。

【0030】

本発明は、前記混合液、平衡溶液、ガラス化溶液に技術的特徴があり、このような混合液、平衡溶液、ガラス化溶液を用いてガラス化した凍結卵子は、凍結過程に卵子内の氷結晶の形成が防止され、細胞内の水が相当除去され、細胞壁と膜が保護され、毒性が顕著に減って生存率が顕著に高くなるという効果がある。

【0031】

本発明は、ガラス化凍結過程を行う前に混合液、平衡溶液、ガラス化溶液を準備する過程を行う（2過程-1）。

【0032】

本発明の混合液は、SSS (Serum Substitute Supplement)、mHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) を混合して作った液を意味する。

【0033】

本発明の混合液は、10~30% SSS (Serum Substitute Supplement) 100重量部にmHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) 300~1000重量部を混合したものが良い。

【0034】

好ましくは、20% SSS (Serum Substitute Supplement) にmHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) を混合した混合液を準備する。

【0035】

本発明の平衡溶液 (Equilibration Solution) は、エチレングリコール (Ethylene glycol)、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) および硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれたHEPES緩衝溶液を含んで作る。

【0036】

本発明は、6.5~8.5% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、6.5~8.5% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、10~30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、25~45 µg/mlの硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれたHEPES緩衝溶液を含んで構成された平衡溶液 (Equilibration Solution) を準備して平衡化させる過程を行う。

【0037】

本発明において、前記硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれたHEPES緩衝溶液は、TCM199 (商品名) という名称で通用しているものを用いることができる。

【0038】

本発明は、より好ましくは、7.5% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、7.5% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、20%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、35 µg/mlの硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれたHEPES緩衝溶液 (TCM199、商品名) から構成された平衡溶液 (Equilibration Solution) を準備して平衡させる。

【0039】

10

20

30

40

50

本発明は、エチレングリコール (Ethylene glycol)、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、スクロース (Sucrose)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成されたガラス化溶液 (Vitrification Solution) を準備して常温に平衡させる過程を行う。

【0040】

本発明は、5～25% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、5～25% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、10～30% デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、0.3～0.6M スクロース (Sucrose)、25～45 μg/ml の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成されたガラス化溶液 (Vitrification Solution) を準備して常温に0.5～2時間平衡させる過程を行う。

10

【0041】

好ましくは、15% (v/v) エチレングリコール (Ethylene glycol)、15% (v/v) ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)、20% デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、0.5M スクロース (Sucrose)、35 μg/ml の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液 (TCM199) から構成されたガラス化溶液 (Vitrification Solution) を準備して常温に0.5～2時間平衡させる過程を行う。

20

【0042】

前記平衡させるとは、混合試薬が常温でできるように濃度が均一になり常温状態と類似になるように置くことを意味する。

【0043】

本発明は、前記回収した卵子に対して hyaluronidase を用いて卵丘細胞の除去過程 (denuding) を経る過程を行う (2過程-2)。

【0044】

本発明は、前記回収した卵子を0.01～0.2% hyaluronidase を用いて卵丘細胞の除去過程 (denuding) を経る過程を行う。

30

【0045】

好ましくは、0.1% hyaluronidase を用いて卵丘細胞の除去過程を経る (denuding) 過程を行いつつ、卵子の成熟有無を検査して成熟した卵子を使用できるようにする。

【0046】

本発明は、前記卵丘細胞を除去した成熟卵子を室温に平衡させた混合液 10～30 μl drop に0.5～2分間処理する過程を行う (2過程-3)。

【0047】

本発明で用いられるドロップ (drop) は水滴形態の液滴を意味する。

40

【0048】

好ましくは、前記卵丘細胞を除去した成熟卵子を室温に平衡させた混合液 (20% S S が含まれた mH T F 溶液) 20 μl drop に1分間処理する過程を行う。

【0049】

本発明は、前記卵子が含まれている混合液に平衡溶液 10～30 μl drop を追加して1～3分間処理した後、再び平衡溶液 10～30 μl drop を追加して1～3分間さらに処理する過程を行う (2過程-4)。

【0050】

好ましくは、卵子が含まれている混合液に平衡溶液 20 μl drop を追加して2分間処理 (総 40 μl) した後、平衡溶液 20 μl drop を追加して2分間処理 (総 6

50

0 μ l) する過程を行う。

【0051】

本発明は、前記処理を経た卵子を再び平衡溶液で5～7分間処理する過程を行う（2過程－5）。

【0052】

好ましくは、前記処理を経た卵子を平衡溶液20 μ l dropで6分間処理する。

【0053】

図2は、卵子のガラス化凍結前の写真であり、図3は、平衡溶液で処理した卵子の写真を示す。

【0054】

本発明は、前記処理した卵子をガラス化溶液に移して0.5～3分間処理する過程を行う（2過程－6）。

【0055】

好ましくは、前記処理した卵子をガラス化溶液50 μ l dropに移して1分間処理する。

【0056】

図4は、ガラス化溶液で処理した卵子の写真を示す。

【0057】

本発明は、前記過程後に卵子を卵子凍結道具に載せてガラス化溶液を最小限に除去した後、直ちに液体窒素に浸漬して保管する過程を行う（2過程－7）。

【0058】

本発明において、卵子を卵子凍結道具に載せてガラス化溶液を最小限に除去するとは、卵子周辺のガラス化溶液を適切に除去することを意味する。

【0059】

前記卵子凍結道具は端部に卵子を載せて液体窒素に浸漬して凍結する道具を意味し、卵子凍結道具としてCryoTop (Kitazato, Japan)を使用することができる。

【0060】

図1に示すように、CryoTop (Kitazato, Japan)は、卵子を凍結させるために使用する道具を意味する。

【0061】

本発明は、上記のような方法で行われたガラス化凍結卵子に対して融解する過程を行う（3過程）。

【0062】

本発明において、融解する過程とは解凍する過程を意味する。

【0063】

本発明は、解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液を準備する過程を行う（3過程－1）。

【0064】

本発明は、前記解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液に技術的特徴があり、このような解凍溶液、希釈溶液、洗浄溶液、回復培養液を用いて解凍したガラス化凍結卵子（凍結解凍卵子）の生存性が顕著に高くなるという効果があり、それにより、本発明に係る凍結解凍卵子は高い核移植培養効果が現れる。

【0065】

本発明の解凍溶液 (Thawing Solution) は、スクロース (Sucrose)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれたHEPES緩衝溶液を含んで構成されている。

【0066】

本発明の解凍溶液 (Thawing Solution) は、0.5～1.5Mスクロ

10

20

30

40

50

ース (Sucrose)、10～30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、25～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成されている。

【0067】

好ましくは、解凍溶液 (Thawing Solution) は、I. OMスクロース (Sucrose)、20%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成されたものが効果的である。

【0068】

本発明の希釈溶液 (Dilution Solution) は、スクロース (Sucrose)、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成される。

【0069】

本発明の希釈溶液 (Dilution Solution) は、0.3～0.7Mスクロース (Sucrose)、10～30%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、25～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成される。

【0070】

好ましくは、希釈溶液 (Dilution Solution) は、0.5Mスクロース (Sucrose)、20%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement) そして35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成されたものが効率的である。

【0071】

本発明の洗浄溶液 (Washing Solution) は、デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成される。

【0072】

本発明の洗浄溶液 (Washing Solution) は、15～25%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、25～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液を含んで構成される。

【0073】

好ましくは、洗浄溶液 (Washing Solution) は、20%デキストラン血清補充剤 (Dextran Serum Supplement)、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) が含まれた HEPES 緩衝溶液 (商品名 TCM199) を含んで構成されたものが効果的である。

【0074】

本発明の回復培養液 (Recovery Medium) は、HEPES 緩衝溶液、ピルビン酸ナトリウム (Sodium pyruvate)、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate)、FBS (Fetal Bovine Serum) を混合して作る。

【0075】

好ましくは、回復培養液 (Recovery Medium) は、HEPES 緩衝溶液 100重量部にピルビン酸ナトリウム (Sodium pyruvate) 0.5～2重量部、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate) 0.5～2重量部、FBS (Fetal Bovine Serum) 2～10重量部を混合して製造する。

【0076】

10

20

30

40

50

本発明は、解凍溶液 (Thawing Solution) を 25~45mm の皿に入れてインキュベータで 35~40℃ に加温させる過程を行う (3 過程-2)。

【0077】

好ましくは、解凍溶液 (Thawing Solution) を 35mm の皿に入れてインキュベータで 37~38℃ に 2~5ml の量で加温させる過程を行う。

【0078】

本発明は、回復培養液 (Recovery Medium) をインキュベータで加温させる過程を行う (3 過程-3)。

【0079】

好ましくは、回復培養液 (Recovery Medium) を 4well 皿に分株してインキュベータで 37~38℃ に 20~40 分程度で加温させる。

【0080】

本発明は、液体窒素に保管された前記卵子凍結道具 (CryoTop) を取り出して加温した解凍溶液に入れ、卵子凍結道具 (CryoTop) に付着している卵子を分離し 1 分間処理する過程を行う (3 過程-4)。

【0081】

好ましくは、液体窒素に保管された卵子凍結道具である CryoTop を取り出して加温した解凍溶液に入れ、CryoTop に付着している卵子を分離し 1 分間処理する。

【0082】

本発明は、前記分離した卵子を常温に平衡させた希釈溶液 30~50 μ l drop に移して 3~5 分間処理する過程を行う (3 過程-5)。

【0083】

好ましくは、前記分離した卵子を常温に平衡させた希釈溶液 40 μ l drop に移して 4 分間処理する。

【0084】

本発明は、前記処理された卵子を常温に平衡させた 2 個の洗浄溶液 30~50 μ l drop に移して順次 3~5 分間ずつ処理する過程を行う (3 過程-6)。

【0085】

好ましくは、処理された卵子を常温に平衡させた 2 個の洗浄溶液 40 μ l drop に移して順次 4 分間ずつ各々処理する。

【0086】

本発明は、前記融解過程後、回復培養のために前記加温した回復培養液で 1~3 時間培養する過程を行う (3 過程-7)。

【0087】

好ましくは、前記融解過程後に回復培養のために回復培養液で 2 時間培養することが良い。

【0088】

図 5 は、解凍溶液で卵子を処理したものを示す写真である。

【0089】

図 6 は、希釈溶液で処理したものを示す写真である。

【0090】

図 7 は、洗浄溶液で卵子を処理したものを示す写真である。

【0091】

本発明は前記過程でイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法で処理された凍結解凍卵子に対して生存性検査 (凍結解凍卵子の生存性検査) を施し、以下の表 1 のような結果を得た。

【0092】

10

20

30

40

50

【表 1】

ガラス化凍結卵子数	融解後の卵子生存率	回復培養後の卵子生存率
59	56 (95%)	53 (90%)

【0093】

全体ガラス化凍結卵子における融解後の卵子生存率は95%程度として非常に高いことが分かり、特に回復培養後の卵子生存率も90%を超過して生存率が顕著に高い効果を示している。

10

【0094】

また、回復培養後、実験が使用可能な90%程度の成熟卵子（凍結解凍卵子）と新鮮卵子を対比する体細胞核移植実験を通じて表2に示すように効率性を比較した。

【0095】

【表 2】

対照群	培養	分割 (%)	8細胞 (%)	16細胞 (%)	胚盤胞 (%)
新鮮卵子	115	101 (87.8)	77 (67.0)	51 (44.4)	9 (7.8)
融解後の卵子	50	29 (58.0)	23 (46.0)	19 (38.0)	3 (6.0)

〔新鮮卵子と融解後の卵子（凍結解凍卵子）の核移植実験を通じた効率性の比較〕

20

【0096】

上記したように、本発明に係る凍結解凍卵子は、新鮮卵子を用いた結果と比較した時、実験過程で重大な欠陥は発見されず、新鮮卵子の結果と類似した研究結果を導き出したところ、本発明に係る凍結解凍卵子は、顕著に高い核移植培養効果があることが分かる。

【0097】

すなわち、胚盤胞ステップにおいて、新鮮卵子と本発明に係る凍結解凍卵子の生存率（%）が類似した研究結果を導き出したところ、本発明に係る凍結解凍卵子は、顕著に高い核移植培養効果があることが分かる。

30

【0098】

本発明は、前記機能と効果からなるイヌ科動物の卵子をガラス化凍結し解凍する方法およびそれによる凍結解凍卵子を提供する。

【産業上の利用可能性】

【0099】

本発明は、体細胞クローンのための動物の卵子を生産、製造、販売、流通、研究する産業に非常に有用である。

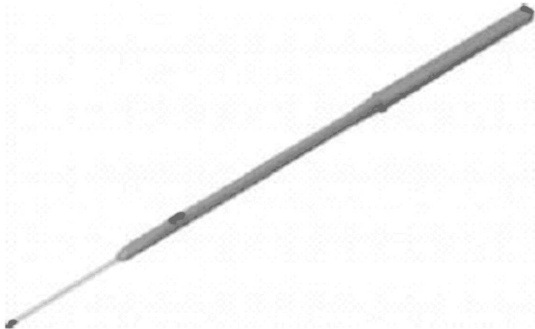
【0100】

特に、本発明は、体細胞クローンのための動物の卵子をガラス化凍結し解凍する技術と装置に対する生産、製造、販売、流通、研究する産業に非常に有用である。

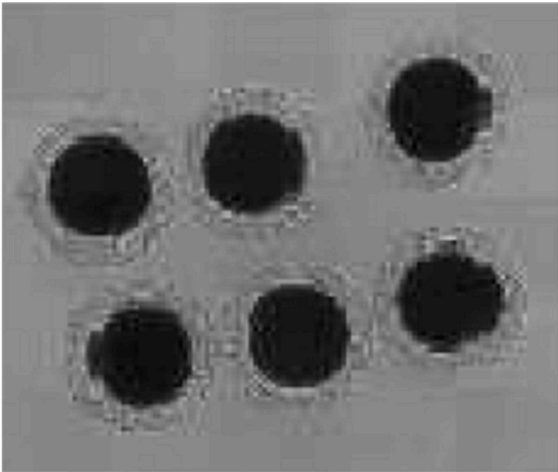
40

【図面】

【図 1】

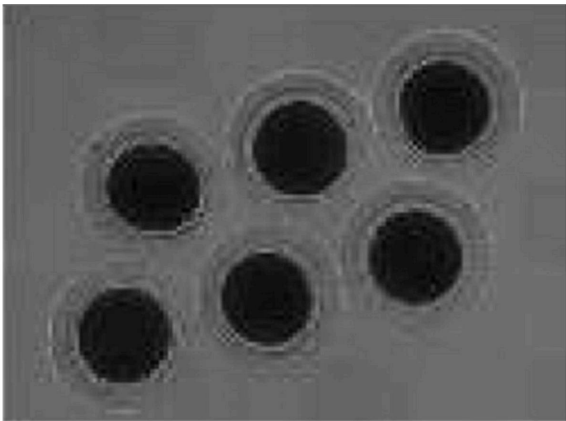


【図 2】

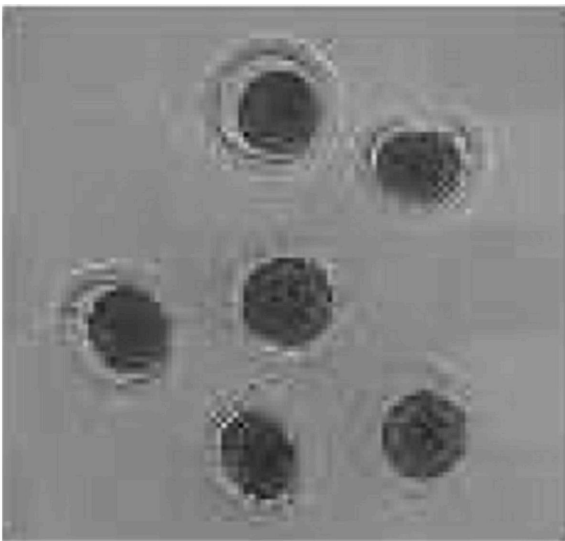


10

【図 3】



【図 4】



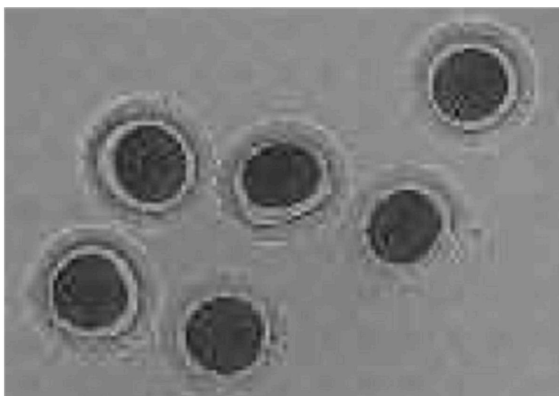
20

30

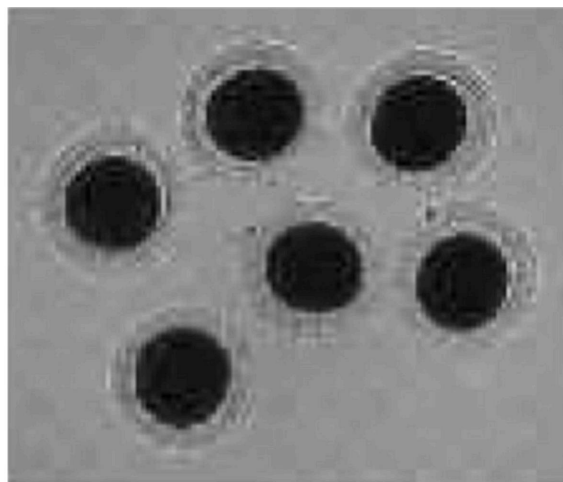
40

50

【図 5】

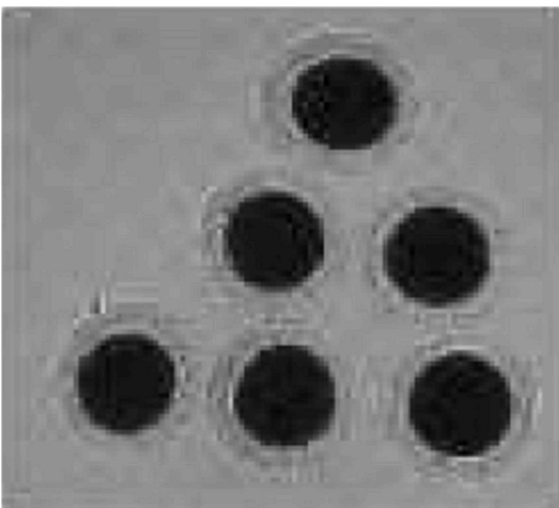


【図 6】



10

【図 7】



20

30

40

50

フロントページの続き

大韓民国 大田廣域市 儒城區 大學路 99
99, Daehak-Ro Yuseong-Gu Daejeon Republic of Korea

(74)代理人 100121728

弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100165803

弁理士 金子 修平

(74)代理人 100170900

弁理士 大西 渉

(72)発明者 キム ミンギュ

大韓民国 34127 デジョン ユソング ジュクドン口 321、102-2401

(72)発明者 ナム ユンソク

大韓民国 33019 チュンチョンナムード ノンサンシ ガヤゴクミョン ガヤ口 201
ボンギル、81-12

(72)発明者 バク ガンソン

大韓民国 30098 セジョンシ ボドウム 2口 43

(72)発明者 ジ グクビン

大韓民国 21948 インチョン ヨンスグ ハンジン口 68-1、5-101

(72)発明者 イ ジヘ

大韓民国 34073 デジョン ユソング ジジョク口 240、504-703

審査官 佐久 敬

(56)参考文献

特開2000-197481 (JP, A)

特開2018-078824 (JP, A)

国際公開第2017/047799 (WO, A1)

特開2007-124978 (JP, A)

特開2007-126471 (JP, A)

特開2000-189155 (JP, A)

特開2009-005584 (JP, A)

特開2001-226201 (JP, A)

韓国公開特許第10-2015-0029191 (KR, A)

KUWAYAMA M., "-Mini Review- Oocyte Cryopreservation" J.Mamm.Ova Res. (2007), Vol.24,
pp.2-7

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)